



Isoenzimas peroxidasas en callos de caña de azúcar sometidos a estrés hídrico

Sergio González y Erik García, Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Biología, Universidad de La Habana

RESUMEN

Se realizó un estudio electroforético de las isoenzimas peroxidasas en callos de diferentes variedades de caña de azúcar sometidas a tratamientos de estrés hídrico provocado por el polietilén glicol (PEG-4000). Se detectan diferencias en el comportamiento de las variedades ante el estrés; en unos casos aparecen nuevas bandas de actividad de isoenzimas peroxidasas, en otros desaparecen algunas bandas, y en otros no hay alteración en el patrón de bandas. Se discuten los resultados.

ABSTRACT

Peroxidase isoenzymes in different sugarcane varieties callus treated with PEG-4000 for water stress induction were studied. Differences between varieties water stress response were detected; in some cases new isoenzyme activity bands were detected; in others there were no changes or some bands disappear. Results are discussed.

INTRODUCCION

El sistema de las isoenzimas peroxidasas es uno de los más ampliamente difundidos en estudios bioquímicos y fisiológicos, ya que constituye un parámetro de la actividad metabólica durante las alteraciones del crecimiento, la diferenciación celular, etcétera.

Los estudios con las peroxidasas no se refieren sólo a los cambios en la actividad, sino también a las variaciones en los patrones isoenzimáticos, los cuales cambian con el estado de desarrollo del tejido estudiado (Galston y cols., 1968). Estos cambios, tanto de patrones como de

actividad, pueden ocurrir por síntesis de novo de la enzima o por la alteración de la síntesis de moléculas ya existentes (Van Huystee y Cairns, 1980).

La presencia o ausencia de diferentes variantes de una misma enzima tiene gran importancia en el trazado del desarrollo y relaciones evolutivas entre géneros, especies y variedades de plantas. Es por esto que las isoenzimas peroxidadas se han utilizado en numerosos estudios de caracterización de variedades en cultivos de interés económico, como la caña de azúcar (Thom y Maretzki, 1970; Waldron y Glasziou, 1972; Waldron y cols., 1974; González y cols., 1982 entre otros). Estos trabajos también se han realizado en progenies de caña de azúcar obtenidas por cultivo in vitro (Heinz y Mee, 1971; Frias y cols., 1975; entre otros). En muchos de esos trabajos se recomienda las determinaciones isoenzimáticas a través de corridas electroforéticas como un método de identificación varietal, capaz de diferenciar de forma sencilla y rápida en la práctica una variedad de otra, en el caso de que posean similitudes fenotípicas (Scandalios y Sorenson, 1977).

Se han comprobado que las modificaciones en la expresión de las isoenzimas en las plantas está influida directamente por el ambiente, es decir que los patrones de actividad se ven afectados ante los estrés ambientales en la caña de azúcar (Hsiao, 1973; González y cols., 1985). En otros estudios se ha confirmado estas variaciones en diversas plantas, no sólo afectadas por la falta de agua, sino también ante estrés salino, infecciones fúngicas y condiciones adversas de iluminación (Coulomb y Coulomb, 1984; Kalir y cols., 1986; entre otros).

En este trabajo nos proponemos evaluar el comportamiento de las isoenzimas peroxidadas en callos de caña de azúcar sometidos a estrés hídrico con PEG-4000.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Se emplearon callos de tejidos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) de seis variedades en estudio: Barbados-63118; Cuba-18768; Cuba-37472; Cuba-8751; Jaronú-605 y la POJ-2878; los cuales fueron obtenidos en cultivo in vitro a partir de las hojas enrolladas del cogollo (spindle). Las diferentes generaciones de callos (Rn) se lograron por trasplantes sucesivos de 45-60 días en tubos de cultivo; en todos los casos bajo iluminación permanente.

Medios de cultivo. Los callos de caña de azúcar se obtuvieron en un medio básico descrito por Murashige y Skoog (1962). Los callos fueron cultivados en medio suplementado con agua de coco al 10 % (v/v), 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 3 mg/mL y kinetina (6-furfuril amino purina) 0,1 mg/mL, (Heinz y Mee, 1969). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 101 kPa.

Estrés hídrico. Para provocar el estrés hídrico en callos se prepararon soluciones de polietilén glicol (PEG-4000) con diferentes concentraciones obteniéndose potenciales osmóticos de -2(S1), -4(S2) y -8(S3)bar. Todas las soluciones utilizadas, así como el control con agua destilada, se esterilizaron en autoclave, al igual que los medios de cultivo.

Determinación de isoenzimas peroxidadas. Se utilizaron los extractos preparados con pequeñas muestras de callos macerados en sacarosa al 20 % y conservados en congelación hasta su utilización. La electroforesis se realizó en gel de policrilamida en una cubeta de corrida vertical, con buffer tris-glicina pH 8,3; a 10 °C, dentro de un refrigerador. Los geles se revelaron con bencidina dihidroclórica (González y cols., 1982). En cada corrida se realizó el zimograma correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la búsqueda de marcadores genético-moleculares y fisiológicos el estudio de las isoenzimas peroxidases ha jugado un importante papel. Las peroxidases están estrechamente vinculadas a numerosos procesos importantes de la fisiología celular y su contenido y composición varía ante alteraciones fisiológicas producidas por un estrés, un daño a la planta, etcétera. Veamos a continuación el comportamiento de las isoenzimas peroxidases de callos de caña de azúcar cultivados *in vitro* y sometidos a estrés hídrico con PEG-4000.

ANALISIS DE LOS PATRONES DE ISOENZIMAS PEROXIDASAS EN SEIS VARIETADES DE CAÑA DE AZUCAR, ANTE CONDICIONES DE ESTRES HIDRICO

Los callos de tejido fueron tratados con PEG-4000 (83) durante tres tiempos: 24, 48 y 72 horas. En cada caso se analizó un control como muestra de comparación.

Aunque nuestro objetivo no consistía en ver las diferencias de los patrones isoenzimáticos entre variedades debemos señalar que en todos los casos dichos patrones de actividad, en las variedades analizadas con un mismo gel electroforético poseían bandas comunes, así como otras que las diferenciaban entre sí, al igual que han señalado otros autores (Thom y Marezki, 1970; González y col., 1982). En la figura 1 se presentan los zimogramas obtenidos para las variedades C-37472 y Ja-605. Al analizar los patrones isoenzimáticos puede observarse que en ambos casos el control posee diferencias en su población con respecto a los tres tratamientos realizados.

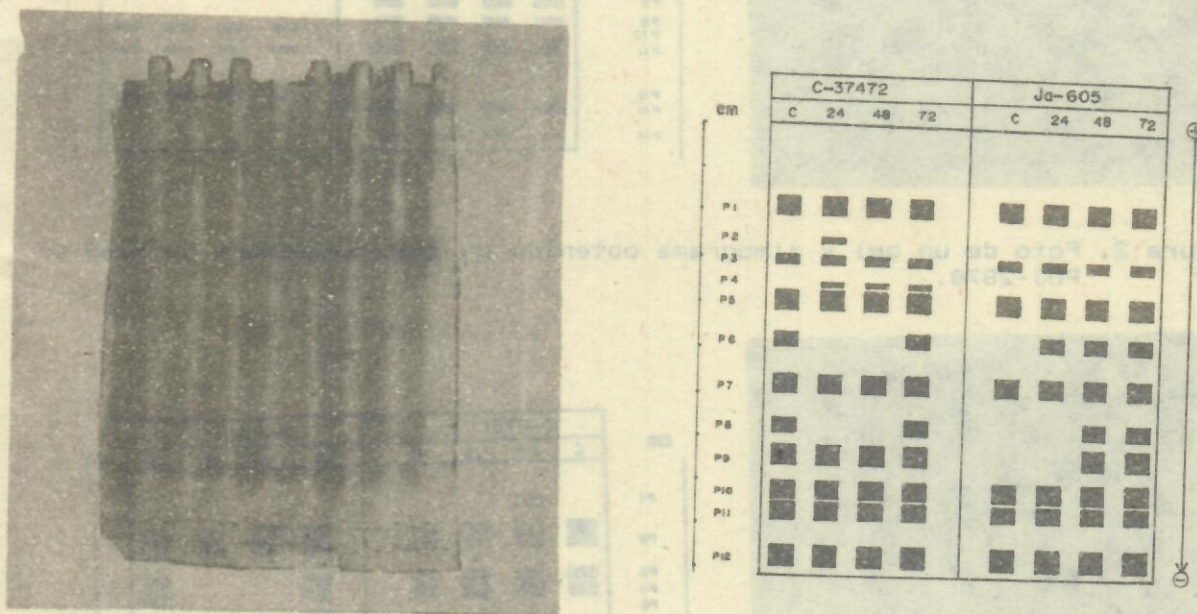


Figura 1. Foto de un gel y zimograma obtenido en las variedades C-37472 y Ja-605

El control en la variedad C-37472 mostró 10 bandas de actividad peroxidasa, de las cuales P6 y P8 están ausentes en los tejidos tratados durante 24 y 48 horas. A las 24 horas aparecen 2 bandas, una P2 que la diferencia del resto y la otra, P4 común también a las 48 y 72 horas. Este último tratamiento tuvo el patrón de actividad más amplio con 11 bandas.

En el caso de la Ja-605 se observó que el control poseía menor actividad. A las 24 horas de tratamiento el tejido incrementa su actividad con la aparición de una banda P6 presente también en los otros dos tratamientos los cuales además, tienen dos bandas adicionales (P8 y P9).

Los resultados obtenidos con las variedades C-18768 y POJ-2878 (figura 2) demuestran que en ambas no se produjo alteración en los patrones isoenzimáticos, mostrándose los zimogramas con 10 y 8 bandas respectivamente.

Las variedades C-8751 y B-63118 sí presentaron alteraciones en los patrones de las isoenzimas peroxidadas, según muestran los zimogramas (figura 3). La C-8751 tuvo un aumento de la actividad a las 24 horas observable por la aparición de la banda P1; sin embargo, a las 48 horas, se encuentra ausente la banda P10. En la variedad B-63118 la respuesta fue más compleja. Para todos los casos el estrés hídrico provocó una disminución, aunque la actividad fue aumentando a medida que las condiciones adversas se prolongaron. En el tratamiento de 24 horas desaparecen 5 bandas de actividad: P3, P4, P5, P8 y P9; a las 48 horas vuelven a aparecen las bandas P8 y P9, y falta la P10; a las 72 horas sólo están ausentes las P5 y P10.

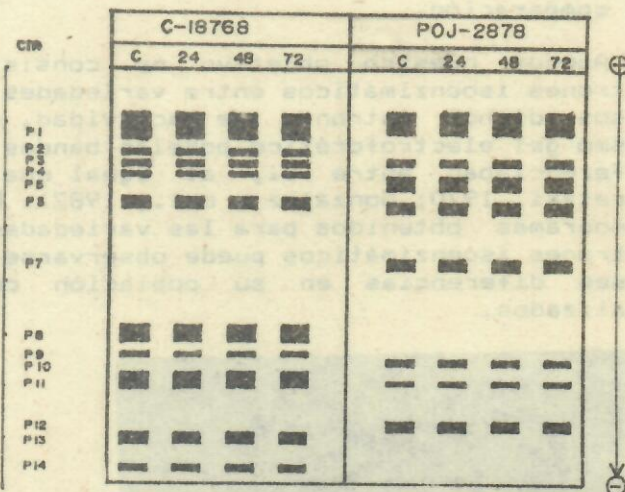
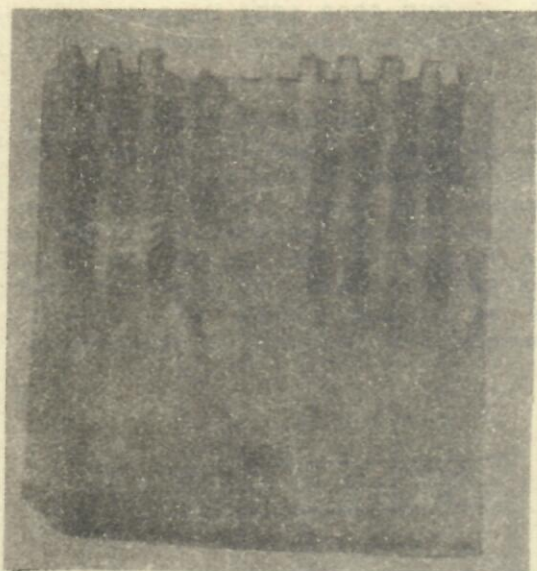


Figura 2. Foto de un gel y zimograma obtenido en las variedades C-18768 y POJ-2878.

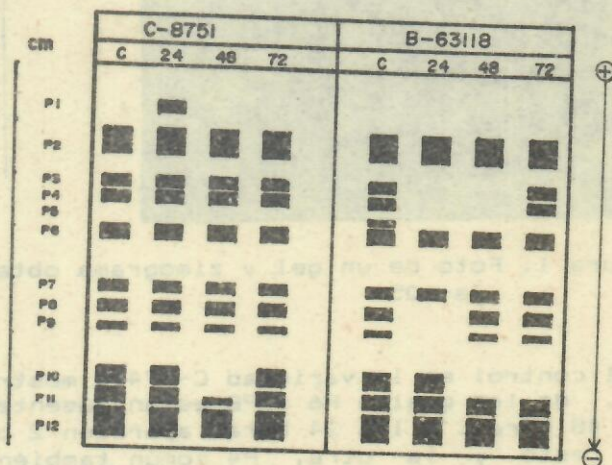
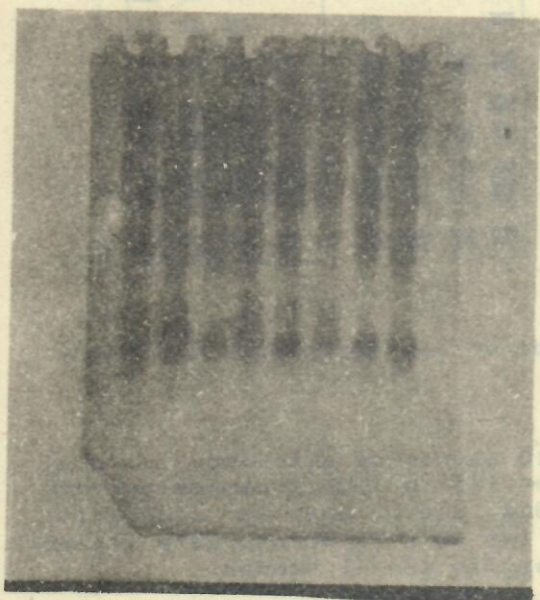


Figura 3. Foto de un gel y zimograma obtenido en las variedades C-8751 y B-63118.

Estos resultados nos permiten plantear que cada variedad muestra una forma particular de responder ante el estrés, en lo que respecta a los patrones de actividad isoperoxidasa.

En unos casos (C-37472 y Ja-605) se observó un aumento de la actividad ante los tratamientos de estrés hídrico más severos, lo cual no se corresponde con lo señalado en la literatura, aunque se debe tener en cuenta que las condiciones del cultivo *in vitro* introducen nuevas peculiaridades al metabolismo celular. En otros hubo comportamiento estable (C-18768, POJ-2878 y C-8751), y en una sola variedad, la B-63118 la actividad disminuyó en los tres tiempos, aunque fue en ascenso de las 24 a las 48 horas.

PATRONES DE ACTIVIDAD DE LAS ISOENZIMAS PEROXIDASAS EN DOS VARIETADES SOMETIDAS A ESTRES HIDRICO

El experimento se realizó con las variedades B-63118 y C-37472, en este caso fijando el tiempo para todos los tratamientos a 48 horas. Los callos se sumergieron en las tres soluciones de PEG-4000 (S1, S2 y S3) descritas y en agua destilada respectivamente.

Como señalamos con anterioridad, cada variedad posee una forma metabólica de responder ante la adversidad que provoca el medio hipertónico en que son embebidos los tejidos, esto puede corroborarse observando los patrones de actividad obtenidos en las dos variedades analizadas (figura 4).

La B-63118 tiene una tendencia similar a la mostrada en el trabajo precedente, es decir, una disminución en el patrón de actividad como respuesta al estrés, en este caso ante potenciales osmóticos externos de -4 y -8bar, para los cuales no aparece la banda P5.

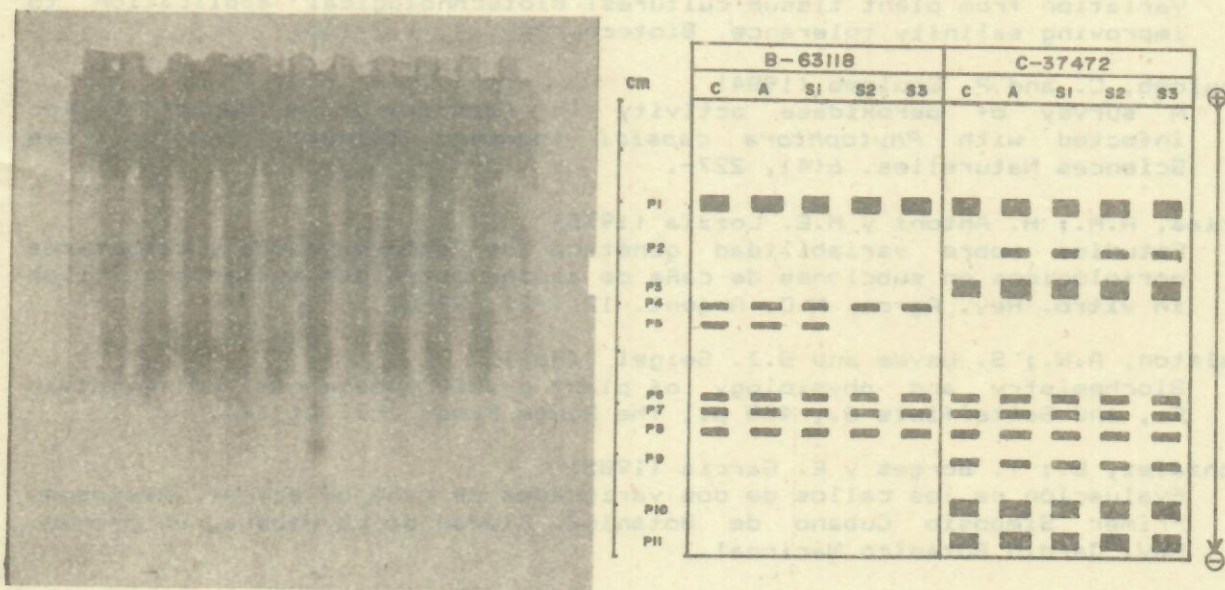


Figura 4. Foto del gel y zimograma obtenidos en las variedades B-63118 y C-37472

La tendencia mostrada, sin embargo, por la C-37472 es de aumento en el número de bandas de actividad, tanto en el callo tratado con agua destilada como en los tratados con las soluciones de PEG-4000. El número de bandas en el control fue de 8, a diferencia del resto de los tratamientos que poseían 9, por presentar la banda P2.

Debemos señalar que el número de formas isoenzimáticas detectadas en este caso no coincide con el patrón obtenido previamente en el experimento con las 6 variedades. La B-63118 mostró 11 bandas de actividad, disminu-

yendo a 6 en este experimento. Para la C-37472 los resultados fueron similares con 10 y 8 bandas respectivamente.

Hasta el momento no se han encontrado cambios en la actividad enzimática en cultivos celulares tolerantes a la salinidad o a la sequía (Chandler y Thorpe, 1986). Sin embargo, en nuestros resultados detectamos variaciones en los patrones de bandas de actividad de las isoenzimas peroxidadas de callos de diferentes variedades de caña de azúcar que fueron sometidos a un estrés hídrico provocado por el PEG-4000. Consideramos que debemos continuar trabajando en este sentido en la búsqueda de un marcador del estado fisiológico de los callos después de sometidos a las condiciones de estrés.

CONCLUSIONES

De nuestros resultados podemos plantear las conclusiones siguientes:

- Los patrones de isoenzimas peroxidadas se ven afectados de forma diferente en las distintas variedades estudiadas, ante los tratamientos de estrés hídrico provocado con PEG-4000.
- Se detecta un mayor número de bandas de actividad peroxidasa en los callos sometidos al estrés hídrico en el caso de las variedades Ja-605 y C-37472. En otras variedades se observa una disminución en el número de bandas, como ocurre en la variedad B-63118; mientras en otras no se altera (C-8751, POJ-2878 y C-18768).

BIBLIOGRAFIA

- Chandler, S.F. and T. Thorpe (1986)
Variation from plant tissue cultures: Biotechnological application to improving salinity tolerance. *Biotech. Adv.* 4, 117-135.
- Coulomb, C. and P. Coulomb (1984)
A survey of peroxidase activity in *Capsicum anuum* (pepper) leaves infected with *Phytophthora capsici* (powdery mildew). *Annales des Sciences Naturelles*. 6(4), 227-.
- Frías, A.M.; H. Antoni y M.E. Lozzia (1975)
Estudios sobre variabilidad genética de isoperoxidadas y caracteres morfológicos en subclones de caña de azúcar obtenidos mediante cultivos in vitro. *Rev. Agron. N.O. Argent.* 12(1-2), 79-80.
- Galston, A.W.; S. Lavee and B.Z. Seigel (1968)
Biochemistry and physiology of plant growth substances, ed. Wightman F., and Setterfiels G., 455 p., The Runge Press Ltd. Ottawa.
- González, S.; T. Borges y E. García (1985)
Evaluación de los callos de dos variedades de caña de azúcar. Resúmenes Primer Simposio Cubano de Botánica, Ciudad de La Habana, En prensa. *Rev. Jardín Botánico Nacional*.
- González, S.; A. Ruiz y R.H. Maribona (1982)
Empleo de marcadores genéticos moleculares para la caracterización de variedades de caña de azúcar. I. Isoenzimas peroxidadas de variedades comerciales. *Rev. J. Bot. Nac.* 3(2), 197-212.
- Heinz, D.J. and G.W.P. Mee (1969)
Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Science* 9, 346-348.
- Heinz, D.J. and G.W.P. Mee (1971)
Morphological, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *Amer. J. Bot.* 58, 257-262.

- Hsiao, T.C. (1973)
Plant response to water stress. *Ann. Rev. Plant Phys.*, 24:519-570.
- Kalir, A.; G. Omri and A. Poljakoff-Mayber (1984)
Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity. *Physiol. Plant.* 62(2), 238-244.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962)
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phys. Plantarum* 15, 473-497.
- Ni D.X.; G. Chen; P.F. Zhan; K.J. Wang and J. Fundan (1986)
The effect of light wavelength on peroxidase isozymes and root formation in callus cultured of *Malva sylvestris* L. *Nat. Sci.* 25(2), 157-162.
- Scandalios, J.G. and J.C. Sorenson (1977)
Isozymes in Plant Tissue Culture. In: Reinert and Y.P.S. Bajaj, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. p. 719-730, Springer Verlag, Berlin.
- Singh, G.; P.S. Tahkur and V.K. Rai (1985)
Effect of water stress on peroxidase activity and isozymic patterns in two *Cicer arietinum* L. varieties with differing sensitivities to water stress. *Acta Agrom. Acad. Sci. Hung.* 34(1-2), 90-94.
- Thom, M. and A. Marezki (1970)
Peroxidase and esterase isozymes in Hawaiian sugarcane. *Hawaiian Planter's Record*, 58(6), 81-94.
- Van Huystee, R.B. and W.L. Cairns (1980)
Appraisal of studies on induction of peroxidase and associated porphyrin metabolism. *The Bot. Rev.* 46(4), 429-446.
- Waldron, J.C. and K.T. Glasziou (1972)
Isoenzymes as a method of varietal identification in sugarcane. *Proc. I.S.S.C.T. 14th Congress, Louisiana. Breeding and Genetics.* 249-256.
- Waldron, J.C.; K.R. Glasziou and J. Daniels (1974)
B-amilase isoenzymes as genetic markers in *Saccharum* and related genera. *Proc. I.S.S.C.T. 15th Congress. Plant Breeding*, 145-152.

Recibido: 11 de agosto de 1988

PUBLICACIONES EDITADAS

Volumen I	No. 1	- 1980	19 de junio	de 1981
Volumen I	No. 2-3	- 1980	8 de julio	de 1981
Volumen II	No. 1	- 1981	21 de julio	de 1981
Volumen II	No. 2	- 1981	30 de nov.	de 1981
Volumen II	No. 3	- 1981	11 de marzo	de 1982
Volumen III	No. 1	- 1982	28 de junio	de 1982
Volumen III	No. 2	- 1982	20 de nov.	de 1982
Volumen III	No. 3	- 1982	10 de marzo	de 1983
Volumen IV	No. 1	- 1983	21 de oct.	de 1983
Volumen IV	No. 2	- 1983	8 de nov.	de 1983
Volumen IV	No. 3	- 1983	27 de feb.	de 1984
Volumen V	No. 1	- 1984	7 de mayo	de 1984
Volumen V	No. 2	- 1984	14 de agosto	de 1984
Volumen V	No. 3	- 1984	7 de mayo	de 1985
Volumen VI	No. 1	- 1985	26 de oct.	de 1985
Volumen VI	No. 2	- 1985	13 de mayo	de 1986
Volumen VI	No. 3	- 1985	4 de sept.	de 1986
Volumen VII	No. 1	- 1986	19 de marzo	de 1987
Volumen VII	No. 2	- 1986	19 de marzo	de 1987
Volumen VII	No. 3	- 1986	23 de abril	de 1987
Volumen VIII	No. 1	- 1987	2 de oct.	de 1987
Volumen VIII	No. 2	- 1987	21 de dic.	de 1987
Volumen VIII	No. 3	- 1987	10 de feb.	de 1988
Volumen IX	No. 1	- 1988	19 de sept.	de 1988